



(19) **RU** (11) **2 145 234** (13) **C1**
(51) Int. Cl.⁷ **A 61 K 38/04**

RUSSIAN AGENCY
FOR PATENTS AND TRADEMARKS

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(21), (22) Application: 94005001/14, 18.02.1994
(24) Effective date for property rights: 18.02.1994
(30) Priority: 19.02.1993 DE P 4305225.8
(46) Date of publication: 10.02.2000
(98) Mail address:
129010, Moskva, ul.B.Spasskaja, 25, str.3,
"Gorodisskij i Partnery"

(71) Applicant:
Asta Medika AG (DE)
(72) Inventor: Jurgen Ehngel' (DE),
Burkkhard Vikhert (DE), Diter Zauerbir
(DE), Tomas Rajssman (DE)
(73) Proprietor:
Asta Medika AG (DE)

(54) **PEPTIDE-BASED LYOPHILIZATE AND METHOD OF PREPARATION THEREOF**

(57) Abstract:

FIELD: biotechnology. SUBSTANCE:
lyophilizate based on peptide with 3-15
amino acid residues and, if necessary, with
at least one structure-forming agent is
prepared by dissolving 1 wt part of peptide
Cetrorelix in 100 to 10000 wt parts of

acetic acid followed by transferring
resulting solution into water and
lyophilization. Lyophilizate is effective in
preparing drugs for treatment of women's
sterility and sex gland protection. EFFECT:
extended drug choice. 8 cl, 1 tbl

RU 2 145 234 C 1

RU 2 145 234 C 1



(19) **RU** ⁽¹¹⁾ **2 145 234** ⁽¹³⁾ **C1**
(51) МПК⁷ **A 61 K 38/04**

РОССИЙСКОЕ АГЕНТСТВО
ПО ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

(21), (22) Заявка: 94005001/14, 18.02.1994
(24) Дата начала действия патента: 18.02.1994
(30) Приоритет: 19.02.1993 DE P 4305225.8
(46) Дата публикации: 10.02.2000
(56) Ссылки: US 5017384, 21.05.91. US 5063204, 05.11.91. Dathe M. "Int.I.Peptide Protein Res.; N 36, 344-349, 1990.
(98) Адрес для переписки:
129010, Москва, ул.Б.Спасская, 25, стр.3,
"Городисский и Партнеры"

(71) Заявитель:
Аста Медика АГ (DE)
(72) Изобретатель: Юрген Энгель (DE),
Буркхард Вихерт (DE), Дитер Зауербир
(DE), Томас Райссман (DE)
(73) Патентообладатель:
Аста Медика АГ (DE)

(54) **ЛИОФИЛИЗАТ НА ОСНОВЕ ПЕПТИДА И СПОСОБ ЕГО ПОЛУЧЕНИЯ**

(57) Реферат:
Изобретение относится к медицине и биотехнологии. Разработан новый лиофилизат на основе пептида и способ его получения, а также применение лиофилизата для приготовления лекарственных средств для лечения женского бесплодия и защиты половых желез. Он представляет собой лиофилизат на основе пептида с 3-15 аминокислотами и, в случае необходимости, с

одним или несколькими структурирующими веществами, при этом он получен путем растворения 1 вес.ч. пептида Cetorelix в 100 - 10000 вес.ч. уксусной кислоты с последующим переводом полученного раствора в воду и лиофилизацией. Техническим результатом изобретения является расширение арсенала средств для лечения женского бесплодия и для защиты половых желез. 2 с. и 6 з.п.ф-лы, 1 табл.

RU 2 145 234 C1

RU 2 145 234 C1

Настоящее изобретение относится к лиофилизату на основе пептида и к способу его получения.

"Cetrorelix" представляет собой декапептид с концевой группой амида кислоты, который используется в виде соли ацетата. Синтез и некоторые фармакологические действия описаны в европейской патентной заявке N 290402.

Биологически активное вещество должно вводиться подкожно в дозе 0,1-20 мг. Водные растворы декапептида нестабильны, автоклавирование в конечной емкости невозможно. Декапептид при обычной для фармакопей стерилизации склонен к разложению. Для того, чтобы получить инъектируемый раствор, требуется поэтому получение лиофилизата.

Правда, количество биологически активного вещества в лиофилизуемом растворе настолько незначительное, что при низких концентрациях биологически активного вещества получается только рыхлый пушок на стеклянной стенке ампулы после высушивания лиофилизата. Поэтому, чтобы получить инъектируемый раствор, требуется поэтому получение лиофилизата. Правда, количество биологически активного вещества в лиофилизуемом растворе настолько незначительное, что при низких концентрациях биологически активного вещества получается только рыхлый пушок на стеклянной стенке ампулы после высушивания лиофилизата. Поэтому, чтобы получить инъектируемый раствор, требуется поэтому получение лиофилизата. Следовательно, необходимо использовать структурообразователь (Gerustbildner), который образует стабильные осадки. При высоких концентрациях от этого вспомогательного вещества можно отказаться. В качестве структурообразователей (каркасообразователей) принимают во внимание следующие вспомогательные вещества: гекситы, в особенности маннит, глюцит, сорбит, как D-сорбит, дульцит, аллит, алтрит (например, D- и L-алтрит), идит (например, D- и L-идит), их оптически активные формы (D-, соответственно, L-формы), а также соответствующие рацематы. В особенности применяют маннит, как D-маннит, L-маннит, DL-маннит; дульцит и/или сорбит, а именно из них предпочтительно D-маннит. В качестве гексита также можно применять смеси указанных гекситов, например смеси маннита и сорбита и/или дульцита. Так как дульцит менее водорастворим, чем, например, маннит, то содержание дульцита в водном растворе не должно превышать, например, 3 вес.%. Маннит и сорбит, напротив, могут смешиваться, например, в любых соотношениях.

Наряду с гекситом также можно добавлять еще другие, обычные фармацевтические вспомогательные вещества, как, например, аминокислоты, как, например, аланин, глицин, лизин, фенилаланин, аспарагиновая кислота, глутаминовая кислота, лейцин, лактоза, поливинилпирролидон, глюкоза, фруктоза, альбумин и эквивалентные структурообразующие вещества. Далее, можно применять мочевины и хлорид натрия в качестве структурообразующих веществ. Общее количество таких веществ в растворе, который используется для сушки вымораживанием, составляет, например, 0-16,9 вес. частей, например, 0,1-7 вес. ч., в расчете на 1 вес. часть Cetrorelix. В готовом лиофилизате общее количество таких вспомогательных веществ может составлять вплоть до 16,9 вес. ч., в расчете на 1 вес.

ч. гексита. В частности, при выборе количества таких вспомогательных веществ руководствуются имеющимся количеством гексита и именно так, чтобы общее количество гексита и таких других вспомогательных веществ в готовом лиофилизате составляло максимально не более чем 17 вес. ч., в расчете на 1 вес. ч. Cetrorelix. В случае, если в лиофилизате находится только 0,1 вес. ч. гексита, то, следовательно, может иметься вплоть до 16,9 вес. ч. других вспомогательных веществ; в случае, если, например, имеются 8,5 вес. ч. гексита, то количество других вспомогательных веществ может составлять, например, вплоть до 8,5 вес. ч., в расчете на 1 вес. ч. Cetrorelix.

Во время разработок по получению лиофилизата, однако, смогли установить, что биологически активное вещество при переработке ведет себя очень различно и не предусматриваемо. Первые композиции приводят к хорошим результатам, однако вскоре оказывается, что при фильтрации в стерильных условиях появляются затруднения и возникают потери.

Из литературы, например из Powell M.F.: *Pharmaceutical Research*, 1258-1263 (8), 1991; Dathe M.: *Int. J. Peptide Protein Res.* 344-349(36), 1990; Szejtli J: *Pharmaceutical Technology International*, 16-22, 1991, известно, что олигопептиды, особенно такие с концевой функцией амида кислоты, склонны к гелеобразованию. При стерильной фильтрации это узнается по скорости фильтрации, часто даже узнают уже органолептически повышенную вязкость такого рода растворов. На стерильном фильтре остается желеобразный слой. Таким образом невозможно получить лекарственное средство с точно определенным содержанием биологически активного вещества.

В таблице перечислены различные результаты первых 11 композиций. Содержания биологически активного вещества колеблются в пределах 100-36%.

Для того, чтобы избежать этого гелеобразования, в литературе указываются следующие добавки, которые используются для опытов:

Речь идет об органических растворителях, например, такие как ацетонитрил, н-бутанол, трет. -бутанол, этанол, изопропанол, октанол и бензиловый спирт. Далее, можно применять соли и буферные растворы, как, например, ацетатный буфер, цитратный буфер, хлорид натрия, фосфат натрия, натриевая соль ЭДТК, бикарбонат натрия, фосфатный буфер, гуанидинацетат, мочевины. Дальнейшее применение могут найти полимеры, как, например, желатина, полиэтиленгликоль 600, гидроксипропилкрахмал, поливинилпирролидон, поливиниловый спирт. Также уже описана добавка аминокислот, например, как аланин, глицин, лизин, фенилаланин, аспарагиновая кислота, глутаминовая кислота и лейцин. Из кислот используется лимонная, каприловая, октановая, соляная, серная и уксусная кислота. Из физиологически безопасных поверхностно-активных веществ имеются в распоряжении бензальконийхлорид, цетиловый спирт, желчные кислоты, лецитин, полисорбаты, Spans® и Pluronic®. Также уже использованы углеводы и

циклодекстрины, как, например, глюкоза, лактоза, маннитол, сахароза, α -, β - и γ -циклодекстрины, гидроксипропил- α - и β -циклодекстрины, гидроксиэтилциклодекстрины и метилциклодекстрины. Эти вспомогательные вещества испытывались в качестве вспомогательного при фильтрации средства для избежания гелеобразования.

Однако, удовлетворительного решения проблемы не было найдено. Лишь подкисление с помощью уксусной кислоты дало частичный успех. Однако здесь также всегда сталкиваются с более высокими потерями при фильтрации.

В настоящее время было неожиданно установлено, что Cetorelix может хорошо растворяться в 30%-ном объем/объем уксусной кислоты. Этот раствор затем доливают до целевой концентрации в 3% Cetorelix водой для инъекции и добавляют маннит. Хотя в литературе было описано, что в кислой среде концевые амидные группы легко гидролизуются, в случае Cetorelix этого не смогли установить. Растворы, которые получают согласно этому способу, при фильтрации не вызывают никаких затруднений. Получают всегда точные содержания биологически активного вещества.

Скорость фильтрации достигает величин, которые обеспечивают удовлетворительное протекание процесса. Общий способ для стерильной лиофилизации описывается в Sucker, Fuchs и Speiser (редакторы) "Pharmazeutische Technologie 2-е издание, 1991, Thieme-Verlag, Штутгарт-Нью-Йорк, на с. 557-559. Дальнейшее описание процесса лиофилизации изложено в выкладке ФРГ 3735614.

Леофилизат находит свое применение в терапии женского бесплодия. Способ лечения до сих пор состоит в том, чтобы путем человеческого гонадотропина менопауз стимулировать соединение фолликул и затем, путем введения человеческого хорион гонадотропина, вызывать овуляцию. Вызванная благодаря этому овуляция происходит спустя 32 часа. Выделенные благодаря этому яйцеклетки доступны для экстракорпорального оплодотворения.

Недостатком этой терапии с помощью агонистов является тот факт, что в фазе стимулирования созревают вплоть до 10 фолликул. Благодаря этому повышенному созреванию фолликул приходят к пикам гормональных уровней LH. Эти пики имеют последствием раннюю стадию созревания фолликул, и овуляция происходит в непредвиденный момент времени. Это нарушение овуляции наступает примерно в 25%-тах случаев лечения и представляет собой недостаток, так как цикл, который проявляет такое нарушение овуляции, теряется для получения яйцеклеток, и все лечение должно повторяться спустя примерно 1 месяц.

Другим недостатком общепринятого стимулирующего лечения является продолжительное время лечения, составляющее 4 недели, которое необходимо, чтобы достичь удовлетворительного подавления. Агонисты, далее, в 1-2% случаев проявляют синдром гиперстимуляции, при котором гипертрофируются клетки фолликул.

Опасность гиперстимуляции особенно велика в случае поликистозных яичников. Синдром гиперстимуляции представляет собой тяжелое побочное действие, которое может привести к смертельным случаям.

В настоящее время установлено, что антагонист Cetorelix даже при этом лечении обладает следующими преимуществами.

Для того чтобы достичь полного подавления, при лечении с помощью Cetorelix достаточно времени лечения 5 дней. Синдром гиперстимуляции не может наступить. Сверх того, во второй фазе лечения можно экономить на фазе вызывания овуляции, HMG. Это представляет собой немалое преимущество в отношении стоимости этого лечения для ин витро - оплодотворения. Ин витро - оплодотворение используется, например, при наличии аномалии труб. Для этой терапии необходимо точно контролировать цикл и по возможности точно устанавливать момент овуляции. До сих пор это достигалось только ограниченно, так как благодаря стимуляции с помощью HMG/HCG часто слишком рано наступал предовуляционный подъем - L. H или не поддерживался достаточно длительное время. Однако решающее значение для успеха лечения имеет предотвращение этого преждевременного подъема для того, чтобы можно было точно установить момент оплодотворения. Благодаря этому уменьшается соматическая и психическая нагрузка пациенток и оптимально используется пребывание в клинике. Для достижения этой цели с высокой надежностью необходимо по возможности полностью подавлять эндогенное продуцирование гормонов (LH-FSH, эстрадиол), чтобы одновременно за счет подачи экзогенного гонадотропина (HMG/HCG) стимулировать созревание фолликул и контролировать в любое время уровень гормонов. Лишь при достижении достаточно высокого количества фолликул (4-5), которые обладают примерно равной степенью зрелости, благодаря введению инъекции HCG-BOIUS вызывается овуляция.

Благодаря использованию антагонистов лечение можно проводить значительно успешнее и безопаснее для пациенток.

Дальнейшей областью применения Cetorelix - леофилизата согласно настоящему изобретению является использование его при защите половых желез мужчин-пациентов. Мужчин-пациентов сначала предварительно лечат с помощью Cetorelix-лиофилизата и поддерживают активность половых желез. Благодаря этому другие вредные патогенные факторы, как, например, лучевая терапия или цитостатическая терапия, не могут или только в незначительной степени могут воздействовать на чувствительные ткани половых желез.

Пример способа получения

В пригодный стеклянный сосуд помещают примерно 1,5 л воды для инъекционных целей. В другой стеклянный сосуд помещают 210 г воды для инъекций и добавляют 91,17 г уксусной кислоты. Рассчитанное количество Cetorelix-ацетата (1,62-1,695 г, в зависимости от содержания используемого наполнителя) при перемешивании растворяют в приготовленной 30%-ной уксусной кислоте. Этот раствор переносят в

стеклянный сосуд с 1,5 л воды для инъекционных целей, добавляют 82,2 г маннитола, растворяют и доливают водой для инъекционных целей до 3039 г.

Контролирование процесса:

pH-значение: 2,5-3,0

плотность: 1,009 - 1,017 г/см³ при 20°C
показатель преломления: 1,227 - 1,340 при 440 нм и 20°C. Стерилизацию раствора осуществляют путем фильтрации через пригодный мембранный фильтр (размер пор 0,2 мкм) при асептических условиях. 100 мл первого погона отбрасывают. Фильтры стерилизуют с помощью водяного пара. Cetorelix-раствор для сушки вымораживанием хранят защищенным от повторного загрязнения. Раствор немедленно дозированно вносят во флаконы для инъекции согласно ДИН 2R, флаконы бесцветные, гидролитического класса 1, при асептических условиях и снабжают стерильными пробками для сушки вымораживанием. Необходимое заполняемое количество составляет 2,0 мл = 2,026 г.

Флаконы для инъекций емкостью 2 мл споласкивают в машине для мытья флаконов для инъекций и высушивают и стерилизуют горячим воздухом. Очищенные пробки для сушки вымораживанием автоклавируют. Предварительно закрытые пузырьки для инъекций переносят в установку для сушки вымораживанием и вымораживают при температуре плиты -40°C. Высушивание осуществляют с помощью программы высушивания при температуре плиты, повышающейся от -40 °C до +20°C. Затем установку заполняют стерильным азотом, флаконы в установке закрывают и пробки снабжают клапаном с бортиком.

Флаконы для инъекций визуально контролируют на дефекты укупорки и наружные дефекты. Флаконы для инъекций с

дефектами отделяют и уничтожают.

Cetorelix-лиофилизат в количестве 1 мг представляет собой белый твердый осадок после сушки вымораживанием в бесцветном, емкостью 2 мл, флаконе для инъекции, который укупорен серой пробкой после сушки вымораживанием и снабжен желтой крышкой с бортиком, открываемой легким нажатием.

Формула изобретения:

1. Лиофилизат на основе пептида с 3 - 15 аминокислотами и, в случае необходимости, с одним или несколькими структурирующими веществами, отличающийся тем, что он получен путем растворения пептида Cetorelix в форме ацетата в количественном соотношении 1 вес.ч. Cetorelix-ацетата в 30 - 130 вес.ч. уксусной кислоты путем перевода полученного раствора в воду с последующей стерилизацией и лиофилизацией.

2. Лиофилизат по п.1, отличающийся тем, что в качестве структурирующего вещества используют маннит.

3. Способ получения Cetorelix-лиофилизата, отличающийся тем, что 1 вес. ч. Cetorelix-ацетата растворяют в 30 - 130 вес.ч. уксусной кислоты, затем переводят в воду и полученный таким образом раствор смешивают с одним или несколькими структурирующими веществами, стерилизуют и лиофилизируют.

4. Способ по п.3, отличающийся тем, что в качестве структурирующего вещества используют маннит.

5. Лиофилизат по пп.1 и 2, используемый в терапии женского бесплодия.

6. Лиофилизат по пп.1 и 2, используемый для защиты половых желез.

7. Лиофилизат по пп.1 и 2, используемый для приготовления лекарственного средства в терапии женского бесплодия.

8. Лиофилизат по пп.1 и 2, используемый для приготовления лекарственного средства для защиты половых желез.

40

45

50

55

60

Ацетат Cetrorelix

Загрузка	Дозировка	Содержание биологически активного вещества, %
1	100 мкг	100
2	500 мкг	100
3	500 мкг	90
4	500 мкг	36
5	500 мкг	100
6	500 мкг	85
7	1 мг	100
8	1 мг	100
9	2 мг	100
10	2 мг	80
11	2 мг	100

RU 2145234 C1

RU 2145234 C1